

PROTEINE DE LEGUMINEUSE GELIFIANTE

Domaine technique

[1] L'invention relève du domaine des protéines végétales, en particulier des
5 isolats protéiques de légumineuse, encore plus particulièrement des isolats
protéiques de pois.

Technique antérieure

[2] Les besoins quotidiens humains en protéines sont compris entre 12 et
20% de la ration alimentaire. Ces protéines sont fournies aussi bien par des
10 produits d'origine animale (viandes, poissons, œufs, produits laitiers) que par des
produits d'origine végétale (céréales, légumineuses, algues).

[3] Cependant, dans les pays industrialisés, les apports en protéines sont
majoritairement sous la forme de protéines d'origine animale. Or, de nombreuses
études démontrent qu'une consommation excessive de protéines d'origine
15 animale au détriment des protéines végétales est une des causes d'augmentation
de cancers et maladies cardio-vasculaires.

[4] Par ailleurs, les protéines animales présentent beaucoup de
désavantages, tant sur le plan de leur allergénicité, concernant notamment les
protéines issues du lait ou des œufs, que sur le plan environnemental en relation
20 avec les méfaits de l'élevage intensif.

[5] Ainsi, il existe une demande croissante des industriels pour des composés
d'origine végétale possédant des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles
intéressantes sans pour autant présenter les inconvénients de composés d'origine
animale.

25 [6] Le soja a été, et reste, la première alternative végétale aux protéines
animales. L'utilisation du soja possède néanmoins des désavantages certains. La
graine de soja est plus que fréquemment d'origine OGM et l'obtention de sa
protéine passe par une étape de déshuilage utilisant du solvant.

[7] Depuis les années 70, les légumineuses à graines, dont en particulier le pois, se sont fortement développées en Europe, majoritairement en France, comme ressource protéique alternative aux protéines animales à destination de l'alimentation animale et humaine. Le pois contient environ 27 % en poids de matières protéiques. Le terme « pois » est ici considéré dans son acception la plus large et inclut en particulier toutes les variétés sauvages de « pois lisse » (« smooth pea »), et toutes les variétés mutantes de « pois lisse » et de « pois ridé » (« wrinkled pea »), et ce quelles que soient les utilisations auxquelles on destine généralement lesdites variétés (alimentation humaine, nutrition animale et/ou autres utilisations). Ces graines sont non-OGM et ne nécessitent pas de déhuilage solvanté.

[8] La protéine de pois, majoritairement de la globuline de pois, est extraite et valorisée industriellement depuis bon nombre d'années. On peut citer, comme exemple de procédé d'extraction de la protéine de pois, le brevet EP1400537. Dans ce procédé, la graine est broyée en absence d'eau (procédé dit de « broyage à sec ») afin d'obtenir une farine. Cette farine sera ensuite mise en suspension dans de l'eau afin d'en extraire la protéine. D'autres procédés d'extraction de protéines de légumineuses sont également décrits dans les documents US4060203 A, FR2889416 A1 et WO 2011/124862 A1. Le document JP55-131351 A décrit la fabrication d'un isolat de protéine de soja dans laquelle une farine, sous forme de fines particules, est mise en solution aqueuse, et une fraction protéique est précipitée en mettant ladite solution aqueuse à pH acide. La solution de protéine précipitée est ensuite neutralisée puis traitée thermiquement, et éventuellement atomisée, afin de former un isolat de protéine de soja.

[9] Les protéines de légumineuses, et en particulier celle de pois, sont cependant nettement moins gélifiantes que celles de soja. Comme présenté dans « Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques » (Bastistaa & al., International Journal of Biological Macromolecules 36 (2005) 135–143, 2005), les protéines de pois et de lupin sont présentées comme moins gélifiantes que la protéine de soja.

[10] Il est donc d'intérêt d'obtenir une protéine de légumineuse, en particulier un isolat protéique de légumineuse, encore plus particulièrement un isolat protéique de pois dont le pouvoir gélifiant ou la force de gel est amélioré. Ces protéines de légumineuses peuvent être intégrées dans des produits alimentaires ou pharmaceutiques. Ces produits peuvent présenter des pH très variables, allant de 4 à 9. Toutefois, dans de nombreuses applications, telles que les substituts de viande ou de poisson, ces protéines sont mises en œuvre à « pH neutre », *i.e.* un pH allant d'environ 6 à environ 8. A titre d'exemple, on peut citer les substituts de viande et de poisson dans lesquels de telles protéines sont utiles pour faire adhérer, après gélification, d'autres protéines texturées entre elles. C'est ainsi qu'il est particulièrement avantageux de pouvoir fournir de nouvelles protéines de légumineuses présentant, comme propriété fonctionnelle améliorée, une force de gel supérieure à pH neutre.

[11] Il y a déjà eu des tentatives de réduire la taille de particules d'isolats et de concentrats de protéines et d'étudier les propriétés fonctionnelles des compositions résultantes. Par exemple, le document Sun et al. (*Reduction of particle size based on superfine grinding: Effects on structure, rheological and gelling properties of whey protein concentrate*, Journal of Food Engineering, Vol. 186, 2016, Pages 69-76) décrit le broyage d'un concentré de protéines de lactosérum utilisant un broyeur à nano-billes. Différentes propriétés des protéines sont étudiées parmi lesquelles la taille de particules, les forces de gel à différents pH, la coloration et la structure par infra-rouge. En ce qui concerne les forces de gel, il résulte du broyage des compositions protéiques présentant, par rapport aux protéines avant broyage, des protéines aux forces de gel à pH acide (4,5) plus fortes et aux forces de gel à pH neutre (6,5) et basique (8,5) plus faibles.

[12] Le document Hayakawa et al. (*Microparticulation by Jet Mill Grinding of Protein Powders and Effects on Hydrophobicity*, Journal of Food Science, Vol. 58, Issue n°5, 1993, pages 1026-1029) décrit quant à lui la microparticulation de protéines de type caséine et blanc d'œuf, ainsi que de fibres de soja en utilisant un broyeur à jets d'air. Ce document ne décrit pas de protéines de légumineuses. Il ne décrit pas non plus d'augmentation de la force de gel des protéines.

[13] Le document Liu et al. (*Ball-milling changed the physicochemical properties of SPI and its cold-set gels*, Journal of Food Engineering, Vol.195, 2017, pages 158-165) décrit l'utilisation de broyeur à billes de type planet BM et Mixer Mill MM400 sur un isolat de protéine de soja, pour en réduire légèrement la taille de particules (taille moyenne de 80 μm). Toutefois, si la force de gel de cet isolat en conditions acides (en présence de glucono-delta-lactone) a pu être augmentée dans le cas du broyage utilisant un broyeur de type Mixer Mill MM400, cette augmentation reste très faible (une augmentation maximale de l'ordre de 30%). Par ailleurs, le broyage par le broyeur de type planet BM n'a conduit à aucune différence sur les forces de gel observées. Egalement, ce document n'étudie pas la force de gel des protéines mises en œuvre à pH neutre.

[14]

Description générale de l'invention

[15] Selon un premier aspect de l'invention, il est proposé une composition protéique de légumineuse, la légumineuse étant notamment choisie parmi le pois, le lupin et la féverole, caractérisée en ce que la force de gel de la composition protéique selon le test A est supérieure à 200 Pa, préférentiellement supérieure à 250 Pa, encore plus préférentiellement supérieure à 300 Pa et tout préférentiellement supérieure à 350 Pa. De manière préférentielle la composition protéique de légumineuse est un isolat protéique de légumineuse et plus préférentiellement un isolat protéique de pois.

[16] Selon un autre aspect, il est proposé un procédé de production d'une composition protéique selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 1) mise en œuvre de graines de légumineuses, préférentiellement choisie entre le pois, le lupin et la féverole;
- 2) broyage des graines et réalisation d'une suspension aqueuse;
- 3) séparation par force centrifuge des fractions insolubles;
- 4) coagulation des protéines par chauffage au pH isoélectrique à une température comprise entre 55°C +/- 2°C et 65°C +/- 2°C, préférentiellement 60°C +/- 2°C, pendant un temps compris entre 3,5 min et 4,5 min, préférentiellement 4 min;

- 5) récupération du floc protéique coagulé par centrifugation;
- 6) rectification du pH à une valeur comprise entre $6 \pm 0,5$ et $9 \pm 0,5$;
- 7) optionnellement, traitement thermique;
- 8) séchage du floc protéique coagulé ;
- 5 9) broyage du floc protéique coagulé par un broyeur à jets d'air et séché afin d'obtenir une taille de particules D90 inférieure à 20 microns, préférentiellement inférieure à 15 microns, encore plus préférentiellement inférieure à 10 microns.

[17] Selon un dernier aspect de l'invention, il est proposé les utilisations industrielles, dans un produit alimentaire ou pharmaceutique, en particulier
10 alimentaires animales et humaines, de la composition protéique de légumineuse, préférentiellement de l'isolat protéique de légumineuse, choisi entre le pois, le lupin et la féverole, encore plus préférentiellement de l'isolat protéique de pois selon l'invention.

[18] L'invention sera mieux comprise grâce à la description détaillée ci-
15 dessous.

Description détaillée de l'invention

[19] Selon un premier aspect de l'invention, il est donc proposé une composition protéique de légumineuse, la légumineuse étant notamment choisie parmi le pois, le lupin et la féverole, caractérisée en ce que la force de gel de la
20 composition protéique selon le test A est supérieure à 200 Pa, préférentiellement supérieure à 250 Pa, encore plus préférentiellement supérieure à 300Pa et tout préférentiellement supérieure à 350 Pa. La légumineuse est tout préférentiellement le pois. A titre d'exemple, la force de gel de la composition protéique selon le test A peut être inférieure à 450 Pa, par exemple inférieure à
25 400 Pa. De manière préférentielle la composition protéique de légumineuse est un isolat protéique de légumineuse et plus préférentiellement un isolat protéique de pois.

[20] Le terme « composition protéique » doit se comprendre dans la présente demande comme une composition obtenue par extraction et raffinage, la dite
30 composition comportant des protéines, macromolécules formées d'une ou de

plusieurs chaînes polypeptidiques constituées de l'enchaînement de résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Dans le cadre particulier des protéines de pois, la présente invention concerne plus particulièrement les globulines (environ 50-60% des protéines du pois). Les globulines de pois se subdivisent principalement en trois sous-familles : les

5 légumineuses, les vicilines et les convicilines.

[21] Par « légumineuse », on comprendra dans la présente demande la famille de plantes dicotylédones de l'ordre des *Fabales*. C'est l'une des plus importantes familles de plantes à fleurs, la troisième après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*

10 par le nombre d'espèces. Elle compte environ 765 genres regroupant plus de 19 500 espèces. Plusieurs légumineuses sont d'importantes plantes cultivées parmi lesquelles le soja, les haricots, les pois, le pois chiche, la féverole, l'arachide, la lentille cultivée, la luzerne cultivée, différents trèfles, les fèves, le caroubier, la réglisse, le lupin.

[22] Par « pouvoir gélifiant », on entend la propriété fonctionnelle consistant en l'habilité d'une composition protéique à former un gel ou un réseau, faisant augmenter la viscosité et faisant générer un état de la matière intermédiaire entre les états liquides et solides. On peut également utiliser le terme « force de gel ».

Pour quantifier ce pouvoir gélifiant, il est donc nécessaire de générer ce réseau et

20 d'évaluer sa force. Pour effectuer cette quantification, dans la présente invention, on utilise le test A dont la description est la suivante :

[23] 1) Solubilisation à 60°C +/- 2°C de la composition protéique testée dans de l'eau titrant 15% +/- 2% en matière sèche et à pH 7;

2) Agitation pendant 5 min à 60°C +/- 2°C;

25 3) Refroidissement à 20°C +/- 2°C et agitation durant 24 heures à 350 tr/min;

4) Mise en œuvre de la suspension dans un rhéomètre à contrainte imposée équipé avec un cylindre concentrique;

5) Mesure des modules élastiques G' et modules visqueux G'' en appliquant un profil de température suivant:

30 a. Phase 1: Mesure du paramètre G'1 après stabilisation à 20°C +/- 2°C et chauffage d'une température de 20°C +/- 2°C à une température de 80°C +/-

2°C en 10 minutes;

b. Phase 2: stabilisation à une température de 80°C +/- 2°C pendant 110 minutes;

c. Phase 3: refroidissement d'une température de 80°C +/- 2°C à une température de 20°C +/- 2°C en 30 min et mesure de G'2 après stabilisation à 20°C +/- 2°C ;

5 6) Calcul du pouvoir gélifiant égal à G'2 – G'1.

[24] De manière préférée, les rhéomètres à contrainte imposée sont choisis parmi les modèles DHR 2 (TA, instruments) et MCR 301 (Anton Paar), avec un mobile de type cylindre concentrique. Ils possèdent un système de régulation de température à effet Peltier. Afin d'éviter les problèmes d'évaporation à haute
10 température, de l'huile de paraffine est ajoutée sur les échantillons.

[25] Un « rhéomètre » au sens de l'invention est un appareil de laboratoire capable de faire des mesures relatives à la rhéologie d'un fluide ou d'un gel. Il applique une force à l'échantillon. Généralement de faible dimension caractéristique (très faible inertie mécanique du rotor), il permet d'étudier
15 fondamentalement les propriétés mécaniques d'un liquide, d'un gel, d'une suspension, d'une pâte, etc., en réponse à une force appliquée.

[26] Les modèles dits « à contrainte imposée » permettent, en appliquant une sollicitation sinusoïdale (mode oscillation), de déterminer les grandeurs viscoélastiques intrinsèques de la matière, qui dépendent notamment du temps
20 (ou de la vitesse angulaire ω) et de la température. En particulier, ce type de rhéomètre permet d'accéder au module complexe G^* , permettant lui-même d'avoir accès aux modules G' ou partie élastique et G'' ou partie visqueuse;

[27] Les trois premières étapes consistent en une remise en suspension de la protéine dans de l'eau, dans des conditions précises permettant de maximiser la
25 mesure postérieure.

[28] L'eau choisie est préférentiellement de l'eau osmosée, mais on peut également utiliser de l'eau potable.

[29] Sa température est de 60°C +/- 2°C lors de la remise en suspension initiale (1ère et 2ème étapes) puis de 20°C +/- 2°C après solubilisation pendant 24h et
30 refroidissement avant mesure (3ème étape). D'une manière générale et sauf

indication contraire, lorsqu'une température est donnée dans la présente description, elle comprend toujours une variation de $\pm 2^\circ\text{C}$, par exemple $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ou $80^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

[30] On ajoute une quantité définie de protéine dans ladite eau afin d'obtenir
5 une suspension titrant $15\% \pm 2\%$ en matière sèche. Pour ce faire, on utilise le matériel bien connu de l'homme du métier tel que béchers, barreaux magnétiques. Agiter un volume de 50mL pendant minimum 10h à 350 tr/min à température ambiante. D'une manière générale et sauf indication contraire, les teneurs en matières sèches données dans la présente description comprennent toujours une
10 variation de $\pm 2\%$, par exemple $15\% \pm 2\%$. Le pH est ajusté à $7 \pm 0,5$ à l'aide d'un pHmètre et de réactifs acido-basiques, comme bien connu dans l'art antérieur.

[31] La quatrième étape consiste à introduire l'échantillon dans le rhéomètre en couvrant celui-ci avec une fine couche d'huile afin de limiter l'évaporation.

[32] On applique alors lors de la cinquième étape un barème de température
15 suivant : a. Phase 1 : chauffage d'une température de $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ à une température de $80^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en 10 minutes ; b. Phase 2 : stabilisation à une température de $80^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 110 minutes ; c. Phase 3 : refroidissement d'une température de $80^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ à une température de $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en 30 min.

[33] La mesure du paramètre G' est effectuée en continu pendant ce barème
20 et est enregistrée.

[34] La sixième et dernière étape du test A consiste en l'exploitation de l'enregistrement. On extrait deux valeurs : $G'1$ = valeur de G' en début de phase 1 après stabilisation à $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ et $G'2$ = valeur de G' en fin de phase 3 après stabilisation à $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

25 **[35]** Le pouvoir gélifiant est égal à $G'2 - G'1$.

[36] De manière préférentielle, la composition protéique de légumineuse selon l'invention présente une richesse en protéine supérieure à 80%, préférentiellement supérieure à 85%, encore plus préférentiellement supérieure à 90% en poids de matière sèche par rapport au poids total de la matière sèche.

[37] La richesse en protéine est mesurée par toute technique bien connue de l'homme du métier. De préférence, on réalise un dosage de l'azote total (en pourcentage en poids d'azote par rapport au poids sec total de la composition) et on multiplie le résultat par le coefficient 6,25. Cette méthodologie bien connue
5 dans le domaine des protéines végétales se base sur le constat que les protéines contiennent en moyenne 16% d'azote. Toute méthode de dosage de la matière sèche bien connue de l'homme du métier peut être également utilisée.

[38] De manière encore plus préférentielle, la composition protéique présente une taille de particules D90 inférieure à 20 microns, préférentiellement inférieure à
10 15 microns, encore plus préférentiellement inférieure à 10 microns.

[39] Par « D90 », on entend dans la présente invention la taille de particules en microns séparant en deux populations en nombre contenant respectivement 90% et 10% de l'ensemble des particules totale de la composition protéique.

[40] Pour effectuer cette mesure du D90, on utilise préférentiellement un
15 granulomètre laser, encore plus préférentiellement le Mastersizer 2000 de la société Malvern. Les paramètres utilisés sont les suivants : Utilisation en voie liquide, dispersion dans de l'alcool éthylique ; Indice de réfraction : 1,52 ; Indice d'absorption : 0,1 ; pas d'utilisation d'ultrasons.

[41] Préférentiellement, la composition protéique selon l'invention présente une
20 solubilité à pH neutre importante. Pour quantifier la solubilité de la composition protéique, on utilise selon la présente invention le test B. Ce test B consiste en les étapes suivantes :

[42] Dans un bécher de 400 mL, on introduit 150 g d'eau distillée à une
température de 20°C +/- 2°C sous agitation avec un barreau magnétique et on
25 ajoute précisément 5 g d'échantillon de protéine de légumineuse à tester. Si besoin, on ajuste le pH à 7 avec NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N. On complète le contenu en eau pour atteindre 200 g d'eau. On mélange pendant 30 minutes à 1000 rpm et on centrifuge pendant 15 minutes à 3000 g. On collecte 25 g du surnageant que l'on introduit dans un cristalliseur préalablement séché et taré. On
30 place le cristalliseur dans une étuve à 103°C +/- 2°C pendant 1 heure. On le place

French

Claims

ensuite dans un dessiccateur (avec agent déshydratant) pour refroidir à température ambiante et on le pèse.

[43] La solubilité correspond au contenu en matières sèches solubles, exprimé en % en poids par rapport au poids de l'échantillon. La solubilité est calculée avec la formule suivante :

[44] [Math. 1]

$$\% \text{ solubilité} = \frac{(m1 - m2) \times (200 + P)}{P1 \times P} \times 100$$

où :

P = poids, en g, de l'échantillon = 5 g

m1 = poids, en g, du cristalliseur après séchage

10 m2 = poids, en g, du cristalliseur vide

P1 = poids, en g, de l'échantillon collecté = 25 g

[45] Avantageusement, la solubilité de la composition protéique de l'invention selon le test B va de 30 à 65%, par exemple de 33 à 62%, notamment de 38 à 15 60%.

[46] Un avantage supplémentaire de l'invention est qu'il est possible d'augmenter les propriétés gélifiantes des protéines de pois, tout en maintenant leur solubilité. Or, ces propriétés peuvent apparaître comme difficilement conciliables : par exemple, une augmentation de la solubilité d'une protéine en effectuant une protéolyse se combine avec une perte de ses propriétés gélifiantes. Sans être liée à une quelconque théorie, ceci s'explique par le fait que, généralement, pour obtenir la formation d'un gel protéique, il faut, une fois les protéines agrégées, que celles-ci forment un réseau. En conséquence, les protéines gélifiantes étant plus grosses, même une fois remises en solution, 20 celles-ci présentent généralement une solubilité moins bonne. Or, l'invention permet de concilier les deux propriétés.

[47] Selon un autre aspect, il est proposé un procédé permettant de produire une composition protéique de légumineuse selon l'invention caractérisé en ce qu'il

comprend les étapes suivantes :

- 1) mise en œuvre de graines de légumineuses, préférentiellement choisie entre le pois, le lupin et la féverole;
- 2) broyage des graines et réalisation d'une suspension aqueuse;
- 5 3) séparation par force centrifuge des fractions insolubles;
- 4) coagulation des protéines par chauffage au pH isoélectrique à une température comprise entre 55°C +/- 2°C et 65°C +/- 2°C, préférentiellement 60°C +/- 2°C, pendant un temps compris entre 3,5 min et 4,5 min, préférentiellement 4 min ;
- 5) récupération du floc protéique coagulé par centrifugation ;
- 10 6) rectification du pH à une valeur comprise entre 6 +/- 0,5 et 9 +/- 0,5 ;
- 7) optionnellement, traitement thermique ;
- 8) séchage du floc protéique coagulé ;
- 9) broyage du floc protéique coagulé par un broyeur à jets d'air afin d'obtenir une taille de particules D90 inférieure à 20 microns, préférentiellement inférieure à 15
- 15 microns, encore plus préférentiellement inférieure à 10 microns.

[48] Le procédé démarre donc par une étape 1) de mise en œuvre de graines de légumineuses, préférentiellement choisie entre le pois, le lupin et la féverole.

[49] Lorsque la légumineuse choisie est le pois, les pois mis en œuvre dans l'étape 1) auront pu subir au préalable des étapes bien connues de l'homme du métier, telles que notamment un nettoyage (élimination des particules non désirées telles que pierres, insectes morts, résidus de terre, etc.) ou bien encore l'élimination des fibres externes du pois (enveloppe externe cellulosique) par une étape bien connue appelée « dehulling ».

[50] Des traitements visant à améliorer l'organoleptique tels qu'un chauffage à sec (ou roasting) ou un blanchiment par voie humide sont également possibles. Pour le blanchiment, la température est préférentiellement comprise entre 70°C +/- 2°C et 90°C +/- 2°C et le pH est ajusté entre 8 +/- 0,5 et 10 +/- 0,5, préférentiellement à 9 +/- 0,5. Ces conditions sont maintenues pendant 2 à 4 min, préférentiellement pendant 3 min.

[51] Le procédé selon l'invention comprend une étape 2) de broyage des graines et réalisation d'une suspension aqueuse. Si les grains sont déjà en

présence d'eau, l'eau est conservée mais peut également être renouvelée, et les grains sont directement broyés. Si les grains sont secs, on réalise tout d'abord une farine et celle-ci est mise en suspension dans l'eau.

[52] Le broyage est effectué par tout type de technologie adéquate connu de l'homme du métier tel que des broyeurs à billes, des broyeurs coniques, des broyeurs hélicoïdaux, des broyeurs à jets d'air ou bien des systèmes rotor/rotor.

[53] Lors du broyage, de l'eau peut être ajoutée de manière continue ou discontinue, au début, au milieu ou en fin de broyage, afin d'obtenir en fin d'étape une suspension aqueuse de pois broyés titrant entre 15% et 25% en poids de matière sèche (MS), préférentiellement 20% en poids de MS, par rapport au poids de ladite suspension.

[54] En fin de broyage, un contrôle du pH peut être effectué. De préférence, le pH de la suspension aqueuse de pois broyés en fin d'étape 2 est ajusté entre 5,5 +/- 0,5 et 10 +/- 0,5, par exemple le pH est ajusté va de 6 +/- 0,5 à 9 +/- 0,5. Alternativement le pH est ajusté entre 8 +/- 0,5 et 10 +/- 0,5, par exemple le pH est ajusté à 9. La rectification de pH peut être effectuée par ajout d'acide et/ou de base, par exemple de la soude ou de l'acide chlorhydrique.

[55] Le procédé selon l'invention consiste ensuite en une étape 3) de séparation par force centrifuge des fractions insolubles. Celle-ci sont majoritairement constituées d'amidon et de polysaccharides appelés « fibres internes ». On concentre ainsi les protéines solubles dans le surnageant.

[56] Le procédé selon l'invention comprend une étape 4) de coagulation des protéines par chauffage au pH isoélectrique à une température comprise entre 55°C +/- 2°C et 65°C +/- 2°C, préférentiellement 60°C +/- 2°C, pendant un temps compris entre 3,5 min et 4,5 min, préférentiellement 4 min. Le but est ici de séparer les protéines de pois d'intérêt des autres constituants du surnageant de l'étape 3). Un tel exemple de procédé est par exemple décrit dans le brevet EP1400537 de la Demanderesse, du paragraphe 127 au paragraphe 143. Il est capital de bien contrôler le barème temps/température : comme il sera exemplifié ci-après dans la partie exemple, ces paramètres sont clés afin d'obtenir une composition protéique gélifiante selon l'invention.

[57] L'étape 5) suivante consiste en la récupération du floc protéique coagulé par centrifugation. On sépare ainsi les fractions solides ayant concentré les protéines, des fractions liquides ayant concentré les sucres et les sels.

[58] Dans une étape 6), le floc est remis en suspension dans de l'eau et son pH est rectifié à une valeur comprise entre $6 \pm 0,5$ et $9 \pm 0,5$. La matière sèche est ajustée entre 10% et 20%, préférentiellement 15% en poids de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension. Le pH est ajusté à l'aide de tout réactif(s) acide(s) et basique(s). L'utilisation d'acide ascorbique, d'acide citrique et de potasse, de soude sont préférés.

10 **[59]** Il est possible de réaliser une étape 7), optionnelle, consistant en un traitement thermique visant à garantir la qualité microbiologique de la protéine. Ce traitement thermique peut également servir à fonctionnaliser la composition protéique. Il est donc préférentiellement effectué selon un barème classique de $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ à $160^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 0,01s à 3s, préférentiellement entre 1 et 2
15 secondes suivi d'un refroidissement immédiat.

[60] Dans une étape 8), le floc protéique coagulé est séché pour atteindre une matière sèche supérieure à 80%, préférentiellement supérieure à 90% en poids de matière sèche par rapport au poids de ladite matière sèche. On utilise pour ce faire toute technique bien connue de l'homme du métier comme par exemple la
20 lyophilisation ou bien encore l'atomisation. L'atomisation est la technologie préférée, en particulier l'atomisation à multiple effet.

[61] La teneur en matière sèche est mesurée par toute méthode bien connue de l'homme de l'art. De manière préférentielle, la méthode dite « par dessiccation » est utilisée. Elle consiste à déterminer la quantité d'eau évaporée
25 par chauffage d'une quantité connue d'un échantillon de masse connue : On pèse l'échantillon au départ et on mesure une masse m_1 en g ; On évapore l'eau en plaçant l'échantillon dans une enceinte chauffée jusqu'à stabilisation de la masse de l'échantillon, l'eau étant complètement évaporée (de préférence, la température est de 105°C sous pression atmosphérique), on pèse l'échantillon final et on
30 mesure une masse m_2 en g. La matière sèche est obtenue par le calcul suivant : $(m_2 / m_1) * 100$.

[62] La dernière étape 9) est tout comme l'étape 4) précédente, clé pour l'obtention de la composition protéique selon l'invention. Elle consiste en un broyage du floc protéique coagulé et séché afin d'obtenir une taille de particules D90 inférieure à 20 microns, préférentiellement inférieure à 15 microns, encore plus préférentiellement inférieure 10 microns. On utilise dans cette étape du procédé de l'invention un broyeur à jets d'air. On préfère néanmoins l'utilisation d'un broyeur à jets d'air opposés, encore plus préférentiellement le Netzsch CGS10. Ce type de broyeurs opère la réduction de taille en générant des collisions : les particules, accélérées par des jets de gaz à grande vitesse sont fragmentées par choc.

[63] Dans un procédé avantageux de l'invention, la force de gel de la composition protéique selon le test A est d'au moins 150% de la force de gel du floc protéique séché à l'étape 8, avantageusement d'au moins 200%, par exemple d'au moins 300%. La force de gel de la composition protéique selon le test A peut être, par exemple, d'au plus 600% de la force de gel du floc protéique séché à l'étape 8.

[64] Comme susmentionné, un des avantages de l'invention est que la solubilité de la protéine peut être maintenue lors de l'étape de broyage. Avantageusement, la solubilité de la composition protéique selon le test B est d'au moins 75% de la solubilité du floc protéique séché à l'étape 8, avantageusement d'au moins 90%.

[65] Un avantage de l'invention est que les compositions protéiques de l'invention peuvent présenter une force de gel plus importante à différents pH, et en particulier à pH neutre, comme dans les conditions du test A. L'utilisation de la composition protéique selon l'invention est avantageuse dans tout type de produit alimentaire et pharmaceutique : le produit alimentaire ou pharmaceutique peut avoir un pH allant de 4 à 9, par exemple de 5 à 8,5, notamment de 6 à 8 ou encore d'environ 7.

[66] Selon un dernier aspect de l'invention, il est proposé les utilisations industrielles, en particulier alimentaires animales et humaines, de la composition protéique de légumineuse, préférentiellement de l'isolat protéique de légumineuse,

choisi entre le pois, le lupin et la féverole, encore plus préférentiellement de l'isolat protéique de pois selon l'invention.

[67] Du fait de son pouvoir gélifiant amélioré, la composition protéique selon l'invention est particulièrement adaptée pour les applications alimentaires telles que les yaourts végétaux ou les succédanés de viandes (« meat-analogs » en anglais). Elle peut notamment être utilisée dans des substituts de viande ou de poisson. Elle peut notamment être utilisée comme agent liant, par exemple comme agent liant utile à la fabrication de substituts de viande ou de poisson. Un autre aspect de l'invention est donc un substitut de viande ou de poisson comprenant la composition protéique de l'invention.

[68] L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples non-limitatifs ci-dessous.

Exemples

[69] Exemple 1 : Production d'une composition protéique de légumineuse selon l'invention

[70] Après décorticage des fibres externes sur broyeur à marteaux, on broie des graines de pois afin d'obtenir une farine. Celle-ci est ensuite mise à tremper dans de l'eau à la concentration finale de 25 % en poids de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension, à un pH de 6,5, pendant 30 minutes à température ambiante. La suspension de farine à 25 % en poids de matière sèche est alors introduite dans une batterie d'hydrocyclones, séparant une phase légère constituée du mélange protéines, fibres internes (pulpes) et solubles et une phase lourde, renfermant l'amidon. La phase légère en sortie d'hydrocyclones est ensuite amenée à une teneur en matière sèche de 10,7 % par rapport au poids de ladite suspension. On procède à la séparation des fibres internes par passage sur des décanteurs centrifuges de type WESTFALIA. La phase légère en sortie de décanteur centrifuge renferme un mélange de protéines et de solubles, tandis que la phase lourde renferme les fibres de pois.

On procède à la coagulation des protéines à leur point isoélectrique par ajustement de la phase légère de sortie de décanteur centrifuge à un pH de 4,6 et

chauffage à 60°C de cette solution pendant 4 min. Après coagulation des protéines, on récupère un floc protéique. Celui-ci est remis en suspension à 15,1% de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension dans de l'eau potable. Le pH de la suspension est rectifié à une valeur de 7 avec de la potasse. On

5 réalise enfin un traitement thermique à 130°C pendant 0,4s suivi d'un refroidissement flash. La suspension est enfin atomisée sur un atomiseur NIRO à multiple-effet MSD, la température d'entrée de l'air étant de 180°C, et celle de sortie étant de 80°C. La poudre obtenue tirent 92,3% de matière sèche par rapport au poids total de la matière sèche dont 85,5% de protéines. Cette poudre est

10 appelée « Base pour composition selon l'invention »

Cette poudre a ensuite été broyée à l'aide d'un broyeur à jets d'air opposés Netzsch CGS10 afin d'obtenir une poudre dont la taille de particules D90 est de 7,3 microns.

La composition protéique en poudre obtenue est appelée « Composition protéique

15 micronisée selon l'invention ».

[71] Exemple 2 : Exemple comparatif visant à démontrer l'influence du barème de chauffage de la composition protéique lors de la coagulation de celle-ci

[72] Le but de cet exemple est de démontrer l'impact du barème de coagulation sur les fonctionnalités de la composition protéique selon l'invention.

20 **[73]** Après décorticage des fibres externes sur broyeur à marteaux, on broie des graines de pois afin d'obtenir une farine. Celle-ci est ensuite mise à tremper dans de l'eau à la concentration finale de 25,1 % en poids de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension, à un pH de 6,5, pendant 30 minutes à température ambiante. La suspension de farine à 25 % en poids de matière

25 sèche est alors introduite dans une batterie d'hydrocyclones, séparant une phase légère constituée du mélange protéines, fibres internes (pulpes) et solubles et une phase lourde, renfermant l'amidon. La phase légère en sortie d'hydrocyclones est ensuite amenée à une teneur en matière sèche de 11,2 % par rapport au poids de ladite suspension. On procède à la séparation des fibres internes par passage sur

30 des décanteurs centrifuges de type WESTFALIA. La phase légère en sortie de

décanteur centrifuge renferme un mélange de protéines et de solubles, tandis que la phase lourde renferme les fibres de pois.

- On procède à la coagulation des protéines à leur point isoélectrique par ajustement de la phase légère de sortie de décanteur centrifuge à un pH de 4,6 et
- 5 chauffage à 70°C de cette solution pendant 4 min. Après coagulation des protéines, on récupère un floc protéique. Celui-ci est remis en suspension à 14,9% de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension dans de l'eau potable. Le pH de la suspension est rectifié à une valeur de 7 avec de la potasse. On
- 10 réalise enfin un traitement thermique à 130°C pendant 0,4s suivi d'un refroidissement flash. La suspension est enfin atomisée sur un atomiseur NIRO à multiple-effet MSD, la température d'entrée de l'air étant de 180°C, et celle de sortie étant de 80°C. La poudre obtenue tire 91,9% de matière sèche par rapport au poids total de la matière sèche dont 84,9% de protéines. Cette poudre est appelée « Base pour Composition protéique comparative n°1 ».
- 15 Cette poudre a ensuite été broyée à l'aide d'un broyeur à jets d'air opposés Netzsch CGS10 afin d'obtenir une poudre dont la taille de particules D90 est de 8,2 microns.

La composition protéique en poudre obtenue est appelée « Composition protéique micronisée comparative n°1 ».

- 20 **[74]** Exemple 3 : Comparaison des différentes compositions protéiques obtenues dans les exemples 1 et 2

[75] Afin de comparer les compositions protéiques, on utilise le Test A tel que décrit précédemment, ainsi que la matière sèche et la richesse protéique :

[76] [Tableau 1]

	Base pour composition protéique selon l'invention	Composition protéique micronisée selon l'invention	Base pour composition protéique comparative n°1	Composition protéique micronisée comparative n°1
Matière sèche (%)	92,3	96,7	91,9	96,5
Richesse protéique (% Matière sèche)	85,5	85,0	84,9	86,1

Pouvoir gélifiant (Pa) selon le Test A	98	375	103	109
D90 (en microns)	233,2	7,3	187,1	8,2

[77] Le Tableau 1 ci-dessus démontre sans équivoque l'extrême importance de la synergie du barème de température de coagulation et de la réduction de la granulométrie à une taille de particules D90 inférieure à 10 microns, afin de maximiser le pouvoir gélifiant. Le pouvoir gélifiant de la composition protéique micronisée selon la présente invention est environs 4 fois plus élevé que la base pour composition protéique selon l'invention, la base pour composition protéique comparative n°1 et la composition protéique micronisée comparative n°1.

[78] Exemple 4 : Production d'une composition protéique de légumineuse selon l'invention

Après décorticage des fibres externes sur broyeur à marteaux, on broie des graines de pois afin d'obtenir une farine. Celle-ci est ensuite mise à tremper dans de l'eau à la concentration finale de 25 % en poids de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension, à un pH de 6,5, pendant 30 minutes à température ambiante. La suspension de farine à 25 % en poids de matière sèche est alors introduite dans une batterie d'hydrocyclones, séparant une phase légère constituée du mélange protéines, fibres internes (pulpes) et solubles et une phase lourde, renfermant l'amidon. La phase légère en sortie d'hydrocyclones est ensuite amenée à une teneur en matière sèche de 10 % par rapport au poids de ladite suspension. On procède à la séparation des fibres internes par passage sur des décanteurs centrifuges de type WESTFALIA. La phase légère en sortie de décanteur centrifuge renferme un mélange de protéines et de solubles, tandis que la phase lourde renferme les fibres de pois.

On procède à la coagulation des protéines à leur point isoélectrique par ajustement de la phase légère de sortie de décanteur centrifuge à un pH de 5,0 et chauffage à 60°C de cette solution pendant 4 min. Après coagulation des protéines, on récupère un floc protéique. Celui-ci est remis en suspension à 18 %

de matière sèche par rapport au poids de ladite suspension dans de l'eau potable. Le pH de la suspension est rectifié à une valeur de 7 avec de la soude. On réalise enfin un traitement thermique à 130°C pendant 0,4s suivi d'un refroidissement flash. La suspension est enfin atomisée sur un atomiseur NIRO à multiple-effet
 5 MSD, la température d'entrée de l'air étant de 180°C, et celle de sortie étant de 80°C. La poudre obtenue tirait 93,2% de matière sèche par rapport au poids total de la matière sèche dont 80,7% de protéines. Cette poudre est appelée « Base 2 pour composition selon l'invention »

Cette poudre a ensuite été broyée à l'aide d'un broyeur à jets d'air opposés
 10 Netzsch CGS10 pendant deux durées différentes, de manière à obtenir première poudre dont la taille de particules D90 est de 16,9 microns et une seconde poudre dont la taille de particules D90 est de 7,9 microns. Les compositions protéiques en poudre obtenues sont appelées respectivement « Composition protéique micronisée selon l'invention 2 » et « Composition protéique micronisée selon
 15 l'invention 3 ».

Afin de comparer les compositions protéiques, on utilise les Test A et B tels que décrits précédemment, ainsi que la matière sèche et la richesse protéique :

[79] [Tableau 2]

	Base 2 pour composition protéique selon l'invention	Composition protéique micronisée selon l'invention 2	Composition protéique micronisée selon l'invention 3
Matière sèche (%)	93,2	96,2	95,6
Richesse protéique (% Matière sèche)	80,7	81,3	81,7
Pouvoir gélifiant (Pa) selon le Test A	112	229	235
Solubilité (%) selon le Test B	43,5	33,8	42,7
D90 (en microns)	253,2	16,9	7,9

Le Tableau 2 ci-dessus démontre encore qu'il est possible de maximiser le pouvoir gélifiant. Le pouvoir gélifiant des compositions protéiques micronisées selon la présente invention est plus de 2 fois plus élevé. Par ailleurs, il est également possible de maintenir la solubilité de la protéine.

Revendications

[Revendication 1] Composition protéique de légumineuse, la légumineuse étant notamment choisie parmi le pois, le lupin et la féverole, caractérisée en ce que la force de gel de la composition protéique selon le test A est supérieure à 200 Pa.

- 5 **[Revendication 2]** Composition protéique selon la revendication 1 dans laquelle la composition protéique de légumineuse est un isolat protéique de légumineuse.

[Revendication 3] Composition protéique selon la revendication 1 ou 2 dans laquelle la légumineuse est le pois.

- 10 **[Revendication 4]** Composition protéique selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce qu'elle possède une richesse en protéine supérieure à 80%, préférentiellement supérieure à 85%, encore plus préférentiellement supérieure à 90% en poids de matière sèche par rapport au poids total de la matière sèche.

- 15 **[Revendication 5]** Composition protéique selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'elle présente une taille de particules D90 inférieure à 20 microns, préférentiellement inférieure à 15 microns, encore plus préférentiellement inférieure à 10 microns.

[Revendication 6] Composition protéique selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisée en ce qu'elle présente une solubilité selon le test B allant de 30 à 65%, par exemple de 33 à 62%, notamment de 38 à 60%.

- 20 **[Revendication 7]** Procédé de production d'une composition protéique selon les revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 1) mise en œuvre de graines de légumineuses, préférentiellement choisie entre le pois, le lupin et la féverole;
- 2) broyage des graines et réalisation d'une suspension aqueuse;
- 25 3) séparation par force centrifuge des fractions insolubles;
- 4) coagulation des protéines chauffage au pH isoélectrique à une température comprise entre 55°C +/- 2°C et 65°C +/- 2°C, préférentiellement 60°C +/- 2°C, pendant un temps compris entre 3,5 min et 4,5 min, préférentiellement 4 min;
- 5) récupération du floc protéique coagulé par centrifugation ;
- 30 6) rectification du pH à une valeur comprise entre 6 +/- 0,5 et 9 +/- 0,5 ;

7) optionnellement, traitement thermique ;

8) séchage du floc protéique coagulé ;

9) broyage du floc protéique coagulé et séché par un broyeur à jets d'air afin d'obtenir une taille de particules D90 inférieure à 20 microns, préférentiellement inférieure à 15 microns, encore plus préférentiellement inférieure à 10 microns.

[Revendication 8] Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le traitement thermique de l'étape 7 consiste en un barème de 100°C +/- 2°C à 160°C +/- 2°C pendant 0,01s à 3s, préférentiellement entre 1 et 2 secondes suivi d'un refroidissement immédiat.

10 **[Revendication 9]** Procédé selon l'une des revendications 7 à 8 caractérisé en ce que le séchage de l'étape 8 est réalisé par atomisation, de préférence par atomisation à multiple effet.

[Revendication 10] Procédé selon l'une des revendications 7 à 9 caractérisé en ce que le broyage de l'étape 9 est réalisé à l'aide d'un broyeur à jets d'air opposés.

15 **[Revendication 11]** Procédé selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisé en ce que la force de gel de la composition protéique selon le test A est d'au moins 150% de la force de gel du floc protéique séché à l'étape 8.

[Revendication 12] Utilisation de la composition selon l'une des revendications 1 à 6 dans un produit alimentaire ou pharmaceutique.

20 **[Revendication 13]** Utilisation selon la revendication 12 dans laquelle le produit alimentaire ou pharmaceutique a un pH allant de 4 à 9, par exemple de 5 à 8,5, notamment de 6 à 8 ou encore d'environ 7.

[Revendication 14] Utilisation selon la revendication 12 ou 13 caractérisée en ce que le produit est un substitut de viande ou de poisson.

Abrégé

L'invention porte sur une composition protéique de légumineuse ayant une force de gel améliorée à pH neutre ainsi que son procédé de production.